

## ESTUDIO GEOMICROBIOLÓGICO DEL PATRIMONIO SUBTERRÁNEO PORTUGUÉS: DEPÓSITOS DE MANGANESO EN LA MINA DAS AVELEIRAS (BRAGA)

**A.M. García-Sánchez<sup>1</sup>, A.Z. Miller<sup>1</sup> H.I. Chaminé<sup>2</sup> y C. Saiz-Jiménez<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), 41012 Sevilla,*

<sup>2</sup>*Laboratório de Cartografia e Geologia Aplicada, Instituto Superior de Engenharia do Porto (DEG|ISEP), 4200-072 Porto, Portugal; Centro GeoBioTec|UA, 3810-193, Aveiro, Portugal*

En los últimos años se han desarrollado iniciativas destinadas a la conservación y revalorización del patrimonio geológico, especialmente en aquellos puntos de interés científico, educativo o turístico, llamados en inglés “geosites”<sup>1</sup>. La geoconservación es la disciplina dedicada a preservar la geodiversidad y el patrimonio geológicos, con el fin de proporcionar un valor añadido del que la sociedad se pueda beneficiar de una manera u otra<sup>2,3</sup>. Esta disciplina es especialmente necesaria en geosites de gran potencial pero cuyo estado de conservación es muy deficiente. Mire de Tibães, situado en el municipio de Braga, noroeste de Portugal, es un claro ejemplo de lo expuesto anteriormente. La zona posee una gran riqueza en patrimonio, tanto cultural como geominero, que incluye entre otros el Monasterio de San Martín de Tibães (siglo XI). Este monasterio entró a formar parte del Patrimonio del Estado Portugués en 1986. Para poder suplir de agua a sus instalaciones, fue imprescindible contar con una infraestructura de minas de agua que se encuentran abandonadas actualmente<sup>4</sup>. Entre la amplia red de minas de agua construida se halla la “Mina das Azeleiras” (siglo XVII), la cual sufrió una reconversión a mina de wolframio entre 1940 y 1962. Excavada en rocas metasedimentarias y graníticas, la Mina das Azeleiras posee un valor científico notable por la gran cantidad de formaciones minerales halladas en su interior cuyo origen puede estar asociado a la actividad microbiana<sup>5</sup>. En este trabajo se han estudiado los depósitos negros de minerales secundarios (espeleotemas) ricos en manganeso que recubren las paredes de la mina, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular y microscopía.

El fin es lograr la identificación de las especies bacterianas presentes y evaluar su posible origen biogénico, es decir, entender si los microorganismos están implicados en la formación de los minerales secundarios. Estos estudios son imprescindibles para valorar la apertura de la mina al público en un futuro cercano en forma de museo geominero, uno de los abordajes más llamativos que ofrece la geoconservación.

Las técnicas de biología molecular empleadas están basadas en el análisis de secuencias del gen ARNr 16S, con el objetivo de identificar especies bacterianas que podrían estar formando asociaciones con los depósitos negros. Para ello, se llevó a cabo la extracción de los ácidos nucleicos totales siguiendo el método descrito por Griffiths y colaboradores<sup>6</sup>. A continuación, el ADN fue amplificado mediante PCR, empleando la pareja de cebadores de bacterias 616F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3')<sup>7</sup> y 1510R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>8</sup>, los cuales amplifican un fragmento de 1500 pb. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% (p/v), empleándose para la purificación el JetQuick PCR Purification Spin Kit (Genomed, Löhne, Germany).

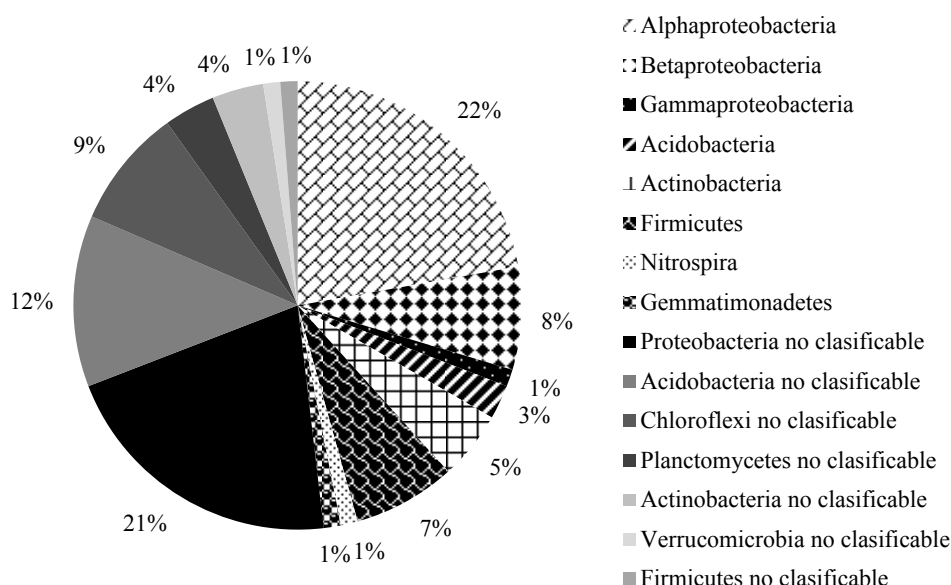
La genoteca de ADN de los productos de PCR purificados se construyó empleando el TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y usando células competentes de *Escherichia coli* (One Shot Max Efficiency DH5a-T1, Invitrogen). Los clones seleccionados fueron secuenciados por Macrogen Europe.

Las secuencias fueron analizadas en busca de quimeras y alineadas mediante el pack de software Mothur<sup>9</sup>. Las secuencias alineadas no quiméricas fueron agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) mediante el software Mothur, con un corte del 97% de identidad. Tras este análisis, la secuencia representativa de cada OTU, se comparó con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando el algoritmo BLASTN y con la base de datos EzTaxon<sup>10</sup>.

Se obtuvieron 76 OTUs de las 81 secuencias analizadas. Los homólogos más cercanos a las secuencias de clones obtenidas en este trabajo proceden de diversas fuentes de aislamiento, siendo una de

las más frecuentes los biofilms de paredes de diversos tubos de lava del archipiélago de Azores, Portugal. Otras fuentes de aislamiento fueron: depósitos en pared de granito en el túnel del Manantial de Paranhos en Oporto (Portugal), suelo de mina de potasio, mina de cobre, rocas de la pared de un cráter, sedimento contaminado de arsénico, suelo de mina de uranio, sedimentos de acuífero, mina de arsénico y oro, zona termal, lepidocrocita (mineral de hidróxido de hierro con impurezas de manganeso) en suelo húmedo, suelo con mineral de hierro, biofilms de depósitos de manganeso y sedimentos ácidos de una mina de pirita. Como se puede comprobar, son entornos subterráneos en su mayoría y de características mineralógicas y geoquímicas muy similares a la Mina das Aveleiras. Entre las fuentes de aislamiento nombradas, son comunes aquellas relacionadas con manganeso y hierro, elementos que se hayan presentes también en las muestras estudiadas.

La mayor parte de los clones estaban afiliados al filo Proteobacteria, siendo la clase Alphaproteobacteria la mayoritaria (22%) junto a Betaproteobacteria (8%) (Figura 1). Las especies representativas de estas clases son *Methylocapsa aurea* y *Cupriavidus gilardi*, respectivamente.



**Figura 1.** Bacterias totales presentes en los depósitos negros recogidos en la Mina das Aveleiras, Portugal.

El género *Cupriavidus* sp. posee metabolismo oxidativo y la característica de resistencia a diferentes metales está extendida entre sus especies, las cuales se pueden encontrar tanto en el medio ambiente como en muestras clínicas, especialmente en personas inmunodeprimidas<sup>11</sup>. Dentro de Alphaproteobacteria, también hallamos otras especies como *Pedomicrobium manganicum*, *Pedomicrobium australicum* e *Hyphomicrobium sulfonivorans*, bacterias filamentosas ubicuas en ambientes ricos en manganeso. Este hecho está relacionado con que son capaces de oxidar dicho elemento e inducir su precipitación<sup>12</sup>, formando depósitos negros de óxidos de manganeso. La producción de óxidos de manganeso ha sido descrita como una función protectora frente a estrés oxidativo e incluso como una ventaja desde el punto de vista de obtención de energía<sup>13</sup>.

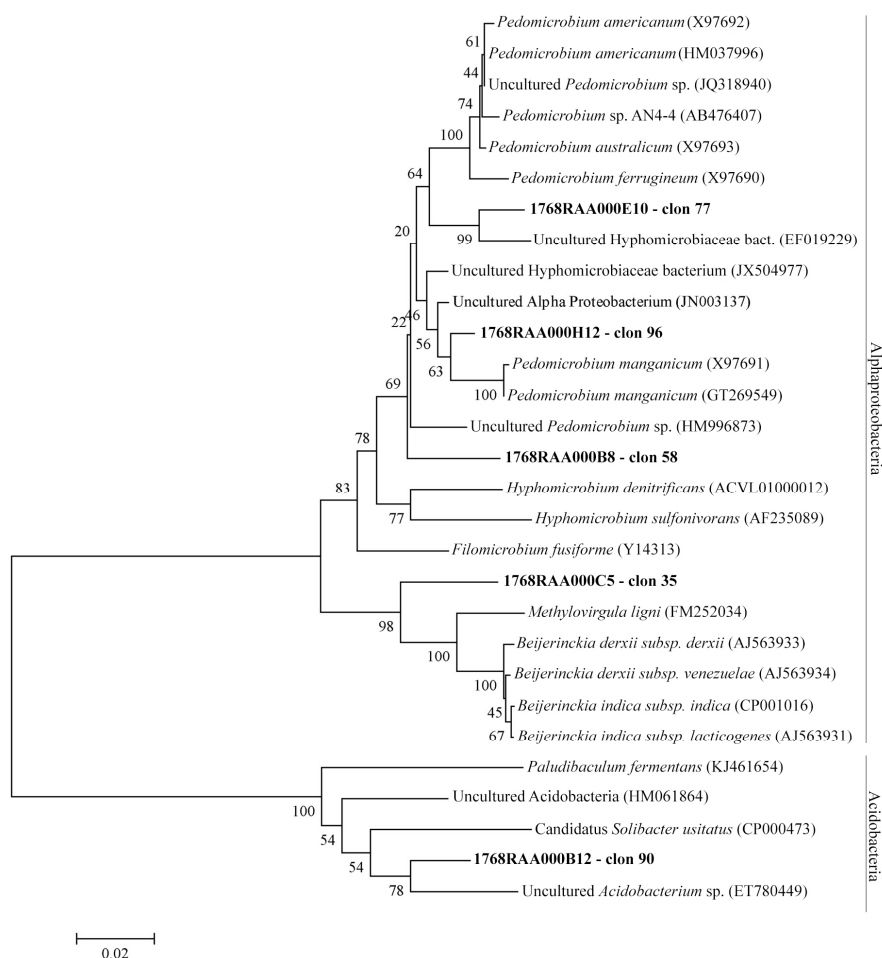
El filo Acidobacteria también estaba presente en gran porcentaje, aunque la mayoría de las bacterias no fue posible clasificarlas a nivel de especie. Muchas han sido aisladas en sedimentos de una mina de pirita, ambiente similar al que nos ocupa en este trabajo. Dentro de este filo, la especie *Candidatus Solibacter usitatus* posee la enzima Mn-catalasa que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, en la que el manganeso juega un papel estructural<sup>14</sup>.

El filo Firmicutes se encontró igualmente en un porcentaje considerable (7%). Algunas de sus especies más representativas fueron *Paenibacillus pocheonensis* y *Pelosinus fermentans*. *Paenibacillus* sp. puede encontrarse en suelos con minerales de hierro<sup>15</sup> y *Pelosinus fermentans* posee la habilidad de reducir metales<sup>16</sup>. Otros filos presentes en menor porcentaje son: Actinobacteria (5%), Nitrospira (1%),

Gemmatimonadetes (1%) y la clase Gammaproteobacteria (1%). Además, el 52% de las secuencias analizadas en este trabajo no se han podido identificar a nivel de especie (Figura 1).

Los análisis mediante técnicas de microscopía electrónica de los depósitos negros de esta mina se llevaron a cabo previamente en el trabajo de Miller y colaboradores<sup>5</sup>. Las observaciones mediante microscopio electrónico de barrido (SEM) pusieron de manifiesto la presencia de microorganismos, como células con ornamentación equinulada y bacterias con forma bacilar. Existían también abundantes agregados nodulares y reticulados, porosos, ricos en Mn, que estaban embebidos en Sustancias Poliméricas Extracelulares (comúnmente conocidas por sus siglas en inglés “EPS”). Estos agregados reticulados mostraron morfología típica de los óxidos de manganeso biogénicos<sup>17</sup>.

Los análisis elementales mediante espectroscopía dispersiva de rayos X (EDS) revelaron que los depósitos negros son ricos en C y Mn. Todo ello pone en evidencia la relación de los microorganismos con la formación de estos depósitos ricos en Mn. En el espectro de FTIR pudo observarse una amplia absorción en la región 3200-3400 cm<sup>-1</sup> además de bandas agudas entre 550 cm<sup>-1</sup> y 400 cm<sup>-1</sup>, lo cual está en consonancia con la absorción por infrarrojo de algunos de los óxidos de manganeso más comunes en la naturaleza<sup>18</sup>.



**Figura 2.** Árbol filogenético de especies asociadas a la oxidación de manganeso en las muestras de depósitos negros de la Mina das Aveleiras, Portugal. El árbol se obtuvo aplicando el método “Neighbour-joining”. Los valores “bootstrap” quedan expresados como porcentajes de 1000 réplicas. La barra representa 0.02 cambios de nucleótido por posición.

Las relaciones filogenéticas establecidas entre las cepas seleccionadas de los depósitos negros de la Mina das Aveleiras, relacionadas con la oxidación del manganeso, y las cepas de referencia de especies homólogas se estudiaron, en base al análisis de la región ARNr 16S (Figura 2). Las bacterias seleccionadas se agrupan en Acidobacteria y Alphaproteobacteria. Los clones 77, 35 y 90 están apoyados por altos valores de “bootstrap” (78-99%) por lo que son clados consistentes. El clon 77 formaría parte de

la familia Hyphomicrobiaceae y por tanto podría estar implicado en la oxidación del manganeso al igual que sus homólogos cercanos. El clon 35 está integrado en otro clado distinto, pero también dentro de Alphaproteobacteria. Su alto valor de “bootstrap” indica cercanía a *Beijerinckia derxii subsp. derxii*, poseedora de la enzima Mn-SOD, superóxido dismutasa que contiene manganeso<sup>19</sup>. Esto puede demostrar la presencia en el mismo ambiente de bacterias oxidantes y reductoras de Mn que coexistirían. El clon 90 queda bien integrado dentro del filo Acidobacteria. Los bajos porcentajes obtenidos para los clones 58 y 96 plantean la existencia de nuevas especies, ya que la afiliación a bacterias ya descritas es cuestionable.

Los depósitos negros de la mina podrían tratarse por tanto de biominerales, que son aquellos formados por la actividad de seres vivos<sup>20</sup>. Los procesos de biomineralización que implican al manganeso son comunes, debido a su relativamente alta concentración en la corteza terrestre<sup>21</sup>. El proceso biogénico de formación de depósitos de óxidos de Mn en ambientes subterráneos puede producirse mediante procesos microbianos<sup>22</sup>. La presencia de bacterias identificadas en este trabajo que tienen la capacidad de oxidar el Mn, junto con los EPS asociados a los depósitos negros, apoyan la idea de que existe un proceso biogénico que da lugar a los espeleotemas ricos en Mn.

La Mina das Aveleiras es un lugar con gran potencial desde el punto de vista de la geoconservación, idóneo para ser adaptado a parque geomínero, lo que daría una segunda vida a la zona del Monasterio de Mire de Tibães que, de otra manera, se vería avocada al olvido y la degradación. Este estudio es importante para averiguar el estado en el que se encuentra la mina, aportando información sobre las bacterias de sus depósitos de manganeso y revelando que los microorganismos son capaces de habitar en ambientes inhóspitos. Además, podrían estar implicados en la formación y precipitación de las estructuras de los minerales secundarios mediante procesos de biomineralización.

*Agradecimientos.* Se agradece al Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto CGL2011-2569) la financiación recibida. A. M. García-Sánchez agradece la financiación del Programa FPU del Ministerio de Educación (AP2010-2052). AZM agradece la financiación de Marie Curie Intra European Fellowship (PIEF-GA-2012-328689-DECAVE). Se agradece al Monasterio de Tibães (DRCN) el apoyo durante el estudio.

<sup>1</sup> E. Reynard, in A.S. Goudie (Ed.), *Encyclopedia of Geomorphology*, Vol. 1. Routledge, Londres, **2003**, p. 440.

<sup>2</sup> M. Gray, *Geodiversity. Valuing and conserving abiotic nature*, John Wiley & Sons, Sussex, **2004**.

<sup>3</sup> M. Brocx, V. Semeniuk, *J. R. Soc. West. Aust.*, **2007**, 90, 53-87.

<sup>4</sup> G.J.A. Coelho Dias, in *Tibães: o encanto da Cerca, o silêncio dos monges e os últimos abades gerais dos beneditinos*. Museu de S. Marthino de Tibães / Mosteiro de S. Bento da Vitória, **2010**, p. 116.

<sup>5</sup> A.Z. Miller, A. Dionisio, M.E. Lopes, M.J. Afonso, H.I. Chaminé, in C. Saiz Jiménez (Ed.), *The Conservation of Subterranean Cultural Heritage*. Taylor & Francis, Londres, **2014**, pp. 103-111.

<sup>6</sup> R.I. Griffiths, A.S. Whiteley, A.G. O'Donnell, M.J. Bailey, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2000**, 66, 5488-5491.

<sup>7</sup> J. Zimmermann, J.M. Gonzalez, W. Ludwig, C. Saiz-Jimenez, *Geomicrobiol. J.*, **2005**, 22, 379-388.

<sup>8</sup> A. Echigo, M. Hino, T. Fukushima, T. Mizuki, M. Kamekura, R. Usami, *Saline Syst.* **2005**, 1, 8.

<sup>9</sup> P.D. Schloss, S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn, C.F. Weber, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2009**, 75, 7537-7541.

<sup>10</sup> J.H. Lee, M. Kim, J. Chun, S.C. Park, Y.S. Jeon, S.H. Yoon, H. Yi, K. Lee, S. Won, O.S. Kim, Y.J. Cho, H. Na, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2012**, 62, 716-721.

<sup>11</sup> P. Vandamme, T. Coenye, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2004**, 54, 2285-2289.

<sup>12</sup> E. Manolache, B.P. Onac, *Cave and Karst Science*, **2000**, 27, 109-112.

<sup>13</sup> W.G. Sunda, D.J. Kieber, *Nature*, **1994**, 367, 62-64.

<sup>14</sup> M. Zámocký, B. Gasselhuber, P.G. Furtmüller, C. Obinger, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2012**, 525, 131-144.

<sup>15</sup> Y. Cao, F. Chen, Y. Li, S. Wei, G. Wang, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2015**, 65, 165-170.

<sup>16</sup> S.D. Brown, M. Podar, D.M. Klingeman, C.M. Johnson, Z.K. Yang, S.M. Utturkar, M.L. Land, J.J. Mosher, R.A. Jr. Hurt, T.J. Phelps, A.V. Palumbo, A.P. Arkin, T.C. Hazen, D.A. Elias, *J. Bacteriol.*, **2012**, 194, 5147-5148.

<sup>17</sup> A.J. Friedrich, E.A. Hasenmueller, J.G. Catalano, *Chem. Geol.*, **2011**, 284, 82-96.

<sup>18</sup> R.M. Potter, G.R. Rossman, *Am. Miner.*, **1979**, 64, 1199-1218.

<sup>19</sup> E.R.B. Moore, E.P. Norrod, P. Jr. Jurtshuk, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1984**, 24, 261-265.

<sup>20</sup> E. Bäuerlein, *Biomineralization: Progress in Biology, Molecular Biology and Application*, Wiley-VHC, Weinheim, **2004**.

<sup>21</sup> R.B. Frankel, D.A. Bazylinski, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **2003**, 54, 95-114.

<sup>22</sup> M.N. Spilde, D.E. Northup, P.J. Boston, R.T. Schelble, K.E. Dano, L.J. Crossey, C.N. Dahm, *Geomicrobiol. J.*, **2005**, 22, 99-116.